Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. K. Bernhard

Beeinflussung der Vitamin-B_6-abhängigen Dehydrierung der Stearinsäure durch Insulin

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

LILLY LINDER-SCHÖNENBERGER
von Walenstadt/St. Gallen

1966

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG
1967

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. K. Bernhard

Beeinflussung der Vitamin-B_6-abhängigen Dehydrierung der Stearinsäure durch Insulin

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

LILLY LINDER-SCHÖNENBERGER

von Walenstadt/St. Gallen

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG
1967

Von der medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. K. BERNHARD

Tag der Promotion: 11. Februar 1966

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen lieben Eltern gewidmet

Herrn Prof. Dr. K. BERNHARD, auf dessen Anregung diese Arbeit entstand, möchte ich an dieser Stelle für seine wertvolle Unterstützung und seine zahlreichen Ratschläge bestens danken.

INHALTSVERZEICHNIS

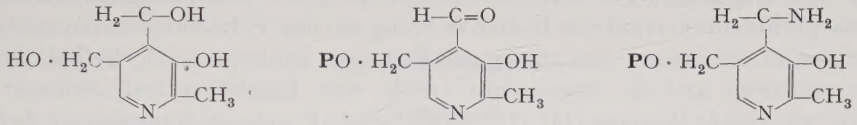
Einleitung 7
Experimentelles 9
Ergebnisse 10
Diskussion der Ergebnisse 11
Zusammenfassung 17
Literaturverzeichnis 19

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546005_0086

Einleitung

Pyridoxin, Vitamin B_6 oder früher Adermin ist ein Pyridinderivat, wobei nach neuen Nomenklaturvorschlägen die Bezeichnung Pyridoxol korrekter ist und unter Pyridoxin die ganze Gruppe, nämlich Pyridoxol, Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat(III) verstanden wird.



Pyridoxalphosphat ist Wirkungsgruppe der Aminotransferasen, der Decarboxyalsen, gewisser Lyasen und Syntheasen.

Wie aus vielen Versuchen hervorgeht, bewirkt B_6-Mangel bei den Versuchstieren stets eine verminderte Nahrungsaufnahme.

Eine spezifische Funktion des Pyridoxins im *Fettstoffwechsel* blieb lange zweifelhaft. Erst 1961 wies Wakil [1] auf die Pyridoxalphosphat-Abhängigkeit eines Enzymsystems hin, das für die Verlängerung der Fettsäureketten verantwortlich sein soll.

Schon früher hatten indessen Witten und Holman [2] festgestellt, dass Ratten bei Mangel an essentiellen Fettsäuren und Pyridoxin, denen Linolsäure gefüttert wurde, weniger Arachidonsäure bildeten als Tiere, die nur an EFS-Mangel litten. Kirschman und Coniglio [3] konnten jedoch durch orale Gaben von ^{14}C-Linolsäure diese Befunde nicht bestätigen.

Andere Untersuchungen betreffen mögliche Zusammenhänge zwischen Vitamin B_6 und dem Stoffwechsel der essentiellen Fettsäuren. Wie György [4] erstmals nachwies, haben die durch B_6-Mangel hervorgerufenen Hautveränderungen grosse Ähnlichkeit mit den durch EFS-Mangel verursachten Hautsymptomen. Es handelt sich dabei um Entzündungen der Haut und um Haarausfall, besonders ausgeprägt an peripheren Körperteilen, und deswegen von Birch [5] als Akrodynie bezeichnet. Die Hauterkrankungen, hervorgerufen durch B_6- und EFS-Mangel, konnten an ihrer Weiterentwicklung durch B_6-Zufuhr gehindert werden. Heilung trat aber nicht ein, der Effekt entsprach lediglich einer subtherapeutischen Dosis von Linolsäure [6], [7]. Dieselben Autoren haben gezeigt, dass die bei jungen Ratten als Zeichen des Vitamin-B_6-Mangels auftretende Wachstumshemmung und Dermatitis durch Linolsäure teilweise zurückgebildet werden. Nicht beeinflussen liessen sich die neurologischen Affektionen, die sich in B_6-avitaminotischen Ratten in epileptiformen Anfällen äussern. Quackenbush und Steenbock [8] beobachteten an Ratten, deren Nahrung kein Pyridoxin und keine Pantothensäure enthielt, einen verminderten Gehalt an Körperfett, welches indessen stärker ungesättigt war. Zu demselben Ergebnis kamen Medes und Keller [9] bei fett- und pyridoxinfreiem Futter. Sherman erzielte diese Beeinflussung des Depotfettgewebes nur durch Pyridoxinmangel [10].

Aus diesen Befunden geht nicht hervor, welche Rolle dem Vitamin B_6 im Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren zukommt. Es ist denkbar, dass sich eine kompensatorische Massnahme des Organismus manifestiert als Antwort auf energetisch ungünstige Bedingungen.

Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung der Carcasslipide von Pyridoxin-Mangelratten führte zu interessanten Ergebnissen [11]. Die Stearinsäure war gegenüber den Kontrolltieren signifikant vermehrt, die Palmitoleinsäure vermindert. SWELL [12] fand signifikant erhöhte Linolsäurewerte in den Serum-Phospholipiden der B_6-Mangelratten, während die Serum-Triglyceride einen signifikant niedrigeren Gehalt an Arachidonsäure aufwiesen.

HUBER und Mitarbeiter [13] untersuchten die Leber und das epididymale Fettgewebe pyridoxinfrei ernährter Ratten in bezug auf ihre Fettsäurezusammensetzung. Dabei stellte sich heraus, dass analog den Befunden JOHNSTONS [11] die Palmitoleinsäure erniedrigt und die Stearinsäure erhöht war. Linolsäure trat vermehrt auf. H. WAGNER und O. WAGNER [14], [15] verabreichten Pyridoxin-Mangelratten 24 Stunden vor dem Tode 250 γ Vitamin B_6 und kontrollierten darauf die Dehydrierung von ^{14}C-Stearinsäure, welche den Tieren 20 Minuten vor dem Tode in Rattenserum emulgiert intravenös appliziert wurde. Die Fettsäurezusammensetzung der Leberlipide der Kontrollen unterschied sich signifikant von jener der B_6-substituierten Tiere, und zwar im Sinne eines erhöhten Stearinsäure- und erniedrigten Palmitoleinsäuregehaltes. Ferner konnte gezeigt werden, dass unter der Einwirkung von B_6 der Einbau des ^{14}C-Atoms in die Palmitinsäure sowie die Umwandlung der ^{14}C-Stearinsäure in Ölsäure sich erheblich steigerten. Die Differenz der Aktivität der Ölsäure aus B_6- und Mangeltieren war wesentlich höher als jene der Palmitinsäure, was eine direkte Einwirkung des Pyridoxins auf die Dehydrierung vermuten lässt.

Offenbar bestehen auch Zusammenhänge zwischen der Wirkung des *Insulins* und der des Pyridoxins. Insulin wurde mit Vitamin B_6 aus verschiedenen Gründen in Zusammenhang gebracht. Rhesusaffen zeigten bei B_6-Avitaminose degenerative Gefässveränderungen [16], [17], [18]. Im Pankreas derselben konnten Fibrosierungen der Intima sowie Hyperplasie und Hypertrophie der Inseln festgestellt werden [19]. Nicht vorschriftsgemäss behandelte Diabetiker reagierten auf Tryptophan-Einnahmen mit vermehrter Xanthurensäure-Ausscheidung [20] als Zeichen gestörten Tryptophanstoffwechsels in Analogie zu den Erscheinungen bei B_6-Mangel [21]. Auch die weitern Auswirkungen des Pyridoxinmangels, wie Abnahme der Depotlipide [24], [25], [26[, Schwund des Leberglykogens [22], [23], können bekanntlich beim Diabetiker auch beobachtet werden.

GELLHORN und BENJAMIN [27], [28] stellten fest, dass in Leber und Fettgewebe diabetischer Ratten die Synthese der Monoen-Fettsäuren aus ^{14}C-Acetat stärker gehemmt war als jene der gesättigten Fettsäuren. Zugabe von Insulin in vitro normalisierte den Aufbau der gesättigten, während die Aktivität der einfach ungesättigten Fettsäuren unverändert niedrig war. Durch Insulinapplikation in vivo konnten auch die Synthese der Palmitolein- und der Ölsäure gefördert werden. Analoge Resultate ergaben Versuche mit ^{14}C-signierter Stearinsäure; erhöhte Ölsäure-Aktivitäten traten nur dann auf, wenn die Tiere in vivo Insulin bekamen.

Insulin vermag die bereits erwähnte, durch Vitamin-B_6-freie Diät bewirkte Abnahme der Nahrungsaufnahme zu verhindern [29]. Die Ablagerung der Depotlipide

bleibt unter dem Einfluss von Insulin im Bereiche der Norm, und die Fettsäurezusammensetzung erfährt keine Veränderungen [13]. Diese Insulineinflüsse bei Pyridoxin-Mangelratten sind deswegen von Interesse, weil sie bei Hungerzuständen, hervorgerufen durch das Fehlen anderer essentieller Faktoren wie z.B. des Vitamins B_1, nicht reproduzierbar waren [13].

Aus der kurzen Literaturübersicht geht hervor, dass Vitamin B_6 nicht nur die Funktion der essentiellen Fettsäuren unterstützt und vielleicht teilweise zu ersetzen vermag, sondern in ähnlicher Weise wie das Insulin in Stoffwechselvorgänge eingreifen kann. Der vorliegenden Dissertation liegt die Fragestellung zugrunde, ob das Ausmass der Dehydrierung von Stearinsäure zu Ölsäure bei bestehender B_6-Avitaminose durch Insulin beeinflussbar ist.

Experimentelles

a) *Fütterung*

19 Ratten im Alter von sechs Wochen, deren Gewicht durchschnittlich 80 g betrug, wurden während 20 Wochen Vitamin-B_6-frei ernährt. Sie wiesen nach dieser Zeit die in Tabelle 1 aufgeführten Gewichte auf. Das Futter bestand aus 25,6% Casein, 58,1% Saccharose, 10,5% Kokosfett und 5,8% Salzmischung nach McCollum.

An Vitaminen wurde den Tieren zweimal wöchentlich verabreicht:

1. 0,5 ml einer Lösung von 0,8 g Cholinchlorid, 4 mg Lactoflavin, 6 mg Panthenol, 4 mg Aneurin, 40 mg Nicotinsäureamid, H_2O ad 40 ml.
2. 5 Tropfen einer Mischung von 12,5 mg Vitamin D_3, 100 mg Carotin, 50 mg Tocopherolacetat, in 62,5 ml Kokosöl gelöst.

24 Stunden vor dem Tode erhielten zehn dieser Tiere 250 γ Pyridoxin-Hydrochlorid (Roche). Frühere Versuche unter Einhaltung derselben Bedingungen liessen nach Einnahme von Vitamin B_6 bereits nach wenigen Stunden eine erhebliche Steigerung der Nahrungsaufnahme erkennen. Die B_6-substituierten Tiere hatten im Zeitraum von 24 Stunden die grössere Futtermenge zu sich genommen als die Kontrolltiere. Um diesen Auswirkungen des Pyridoxins vorzubeugen, wurde allen Ratten 7 g Diätkuchen zur Verfügung gestellt. Diese Menge entsprach der durchschnittlichen Tagesration der Mangeltiere.

b) *Applikation des Insulins und der ^{14}C-Stearinsäure*

Um den Wirkungseintritt und die Dosierung von Insulin Novo ultralente zu ermitteln, injizierten wir normalen Ratten intraperitoneal verschiedene Insulinmengen. Wir beobachteten, dass $^1/_2$ E pro 100 g Körpergewicht dieses protrahiert wirkenden Insulins bei völliger Sistierung der Nahrungszufuhr nach vier bis fünf Stunden eine abnorme Trägheit der spontanen Bewegungen sowie eine starke Herabsetzung von Geschwindigkeit und Intensität der Reaktionen auf äussere Einflüsse zur Folge hatte. Kurze Zeit darauf stellten sich Atemstörungen und Konvulsionen ein. Die Tiere starben nach fünf bis sechs Stunden. Dagegen wurde $^1/_4$ E pro 100 g Körpergewicht unter gleichen Bedingungen gut ertragen. Hypoglykämische Symptome waren nicht feststellbar. In der Folge injizierten wir ca. $5^1/_2$ Stunden vor dem Tode je fünf B_6-Ratten und fünf Mangelkontrollen $^1/_4$ E pro 100 g Körpergewicht Insulin Novo ultralente intraperitoneal. Anschliessend wurde allen Tieren das Futter entzogen.

Die ^{14}C-Stearinsäure haben wir, um sie in möglichst physiologischer Form verabreichen zu können, in Rattenserum emulgiert [14]. 0,2 ml dieser Emulsion wurde allen Tieren fünf Stunden nach den Insulingaben unter leichter Äthernarkose in die Oberschenkelvene injiziert. Diese Dosis enthielt 1,006 mg ^{14}C-Stearinsäure entsprechend einer Aktivität von $16{,}113 \cdot 10^6$ c/min. Die spezifische Aktivität der Stearinsäure betrug $16{,}017 \cdot 10^6$ c/min.

c) *Aufarbeitung der Ratten*

20 Minuten nach der Stearinsäure-Applikation wurden die Tiere mit Äther narkotisiert und durch Herzpunktion getötet. Ihre Lebern wurden mit 3,8%iger Natriumcitrat-Lösung gespült, um die sich noch im Blut befindende aktive Stearinsäure zu eliminieren.

Aus Leber und Carcass (Tierkörper nach Entfernung der Leber) wurden nach Verseifung mit 30%iger methanolischer KOH die Fettsäuren isoliert. Ihre Methylester erhielten wir mittels Bortrifluorid in Methanol. Sie wurden gaschromatographisch analysiert an einer 17% Äthylenglycolsuccinat enthaltenden Hyflo-Supercell-Kolonne. Durch Chromatographie an einer Silicagel-Kolonne [30], enthaltend 10% Silbernitrat, trennten wir die gesättigten von den ungesättigten Fettsäuremethylestern. Die Aktivitäten der gesamten sowie der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wurden im Tricarb-Scintillation-Counter gemessen.

Ergebnisse

Unsere Versuchstiere zeigten alle mit unterschiedlicher Ausprägung die von György beschriebenen Hautveränderungen. Dabei waren die Defekte in der Behaarung auffallender als die entzündlichen Erscheinungen. Das Depotfettgewebe war spärlich ausgebildet. Die Leber war zum Teil unauffällig, zum Teil vergrössert und hell.

Die Verseifung der Lebern ergab stark schwankende Mengen an Gesamtfettsäuren; es lagen in vielen Fällen ausgesprochene Leberverfettungen vor. Der Carcass enthielt stets wenig Fett; die Verseifung führte zu 3–4% Fettsäuren, bezogen auf das Carcassgewicht (vgl. Tabelle 1). Die prozentualen Anteile an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sind aus der Tabelle 2 ersichtlich. Die Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren aus der Leber enthält Tabelle 3, diejenige der Gesamtfettsäuren aus dem Carcass Tabelle 4. Die Resultate der Aktivitätsmessungen, ausgedrückt in spezifischer und Gesamtaktivität, sind für die Gesamtfettsäuren aus Leber und Carcass und für die gesättigten bzw. ungesättigten Säuren in den Tabellen 5–7 aufgeführt. Diese Daten erlauben, den Einbau des 1-^{14}C-Atoms der Stearinsäure in die Gesamtfettsäuren, die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren aus Leber und Carcass zu berechnen (Gesamtaktivität $\times$ 100/applizierte Aktivität) (Tabellen 8 und 9). Schliesslich sind in der Tabelle 10 die Aktivitätsanteile der ungesättigten Fettsäuren aus Leber und Carcass in Prozenten der Gesamtaktivität angegeben. Dabei wurde, um das Ausmass der Dehydrierung zu erfassen, die Summe der Gesamtaktivitäten von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren gleich 100% gesetzt (Aktivität der ungesättigten Fettsäuren $\times$ 100/Aktivität [gesättigte + ungesättigte Fettsäuren)].

Diskussion der Ergebnisse

Linol- und Linolensäure können im Organismus nicht synthetisiert werden [31], [32]. Ölsäure entsteht durch Dehydrierung aus Stearinsäure [33]. Dieser Vorgang ist abhängig von der Vitamin-B_6-Versorgung; nach intravenösen Gaben von 1-^{14}C-Stearinsäure an B_6-Mangeltiere ist die Aktivität der Ölsäure signifikant tiefer. In den vorliegenden Untersuchungen liess sich das bestätigen, wenn auch die Unterschiede gegenüber den Kontrollen weniger ausgeprägt sind als bei den Versuchen von WAGNER [14], [15]. Da durch Abbau der ^{14}C-Stearinsäure der Acetyl-CoA-Pool auf Grund der geringen Signierung der Palmitinsäure kaum aktiv ist [15], konnten wir uns damit begnügen, die Gesamtfettsäuren in gesättigte und ungesättigte Anteile zu trennen und deren Aktivität zu messen, die durch die Gehalte an Stearin- bzw. Ölsäure bedingt wurde.

Die lange Dauer des Pyridoxinmangels hatte sich auf unsere Tiere ungleich stark ausgewirkt, was deutlich aus den unterschiedlichen Lipidmengen von Leber und Carcass hervorgeht (Tabelle 1). Die isolierten Fettsäuren schwanken mengenmässig sehr stark (Tabellen 3 und 4). Gleichwohl ergaben sich nach Pyridoxingaben schon nach 24 Stunden deutliche Zunahmen im Ausmasse der Stearinsäure-Dehydrierung (Tabelle 10).

Tabelle 1

Gesamtfettsäuren aus Leber und Carcass

Tier Nr.	Vitamin B_6	Tier-gewicht g	Leber-gewicht g	Fettsäuren % des Leber-gewichtes	Carcass-gewicht g	Fettsäuren % des Carcass-gewichtes
			ohne Insulin			
1	–	92	3,30	4,41	91,35	2,87
2	–	162	6,75	20,93	155,65	2,60
3	–	177	7,35	13,27	160,80	4,50
4	–	184	6,65	3,97	174,30	6,80
5	+	130	4,75	6,78	118,90	2,16
6	+	141	5,05	15,65	130,50	4,69
7	+	145	7,05	22,72	135,20	3,00
8	+	156	4,05	4,41	143,90	4,18
9	+	164	4,40	6,08	153,20	3,07
			mit Insulin			
10	–	123	4,30	13,75	113,90	4,99
11	–	127	4,45	7,30	123,65	2,55
12	–	135	4,10	8,37	128,10	4,07
13	–	168	4,80	6,44	157,40	4,41
14	–	176	7,95	22,64	163,35	4,23
15	+	132	4,65	8,13	121,85	3,01
16	+	146	4,95	5,18	134,50	5,04
17	+	143	4,40	4,58	138,90	5,86
18	+	151	5,35	11,51	140,20	3,04
19	+	155	4,80	6,92	141,10	4,55

Tabelle 2

Prozentuale Anteile der Gesamtfettsäuren an gesättigten und ungesättigten Säuren

Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Leber		Carcass	
			gesättigte Fettsäuren % der Gesamtfettsäuren	ungesättigte Fettsäuren % der Gesamtfettsäuren	gesättigte Fettsäuren % der Gesamtfettsäuren	ungesättigte Fettsäuren % der Gesamtfettsäuren
1	–	–	37,23	62,77	44,99	55,01
2	–	–	42,91	57,09	46,83	53,17
3	–	–	41,43	58,57	46,83	53,17
4	–	–	42,23	57,77	49,96	50,04
Mittelwert			*40,95*	*59,05*	*47,15*	*52,85*
5	+	–	36,95	63,05	42,43	57,57
6	+	–	34,37	65,63	48,51	51,49
7	+	–	39,45	60,55	48,37	51,63
8	+	–	40,18	59,82	52,26	47,74
9	+	–	36,39	63,61	44,35	55,65
Mittelwert			*37,47*	*62,53*	*47,18*	*52,82*
10	–	+	41,16	58,84	49,37	50,63
11	–	+	39,01	60,99	45,82	54,18
12	–	+	39,41	60,59	49,44	50,56
13	–	+	40,46	59,54	50,16	49,84
14	–	+	38,72	61,28	49,04	50,96
Mittelwert			*39,75*	*60,25*	*48,77*	*51,23*
15	+	+	38,08	61,92	46,47	53,53
16	+	+	35,49	64,51	47,26	52,74
17	+	+	35,91	64,09	49,35	50,65
18	+	+	41,43	58,57	48,57	51,43
19	+	+	39,52	60,48	47,84	52,16
Mittelwert			*38,09*	*61,91*	*47,90*	*52,10*

Bei den B_6-Mangelratten ist die Aktivität der Gesamtfettsäuren aus den Carcasslipiden spezifisch höher als nach Pyridoxingaben. Das trifft für die Leberfettsäuren nicht zu. Insulingaben verstärkten diesen Unterschied, ohne dass dafür vorerst eine überzeugende Erklärung vorhanden wäre (Tabelle 5). Bei den B_6-Tieren hatte Insulin einen signifikant vermehrten Einbau von Stearinsäure in die Gesamtfettsäuren der Leber zur Folge (Tabelle 8). Man könnte daraus auf einen hemmenden Einfluss auf den Stearinsäureabbau oder generell auf den Fettabbau schliessen.

Wie eingangs erwähnt wurde, treten bei Diabetes mellitus ähnliche Symptome auf wie beim Vitamin-B_6-Mangel. Nach SUPPLEE und Mitarbeitern [34] stimuliert eine Testmahlzeit hungernde B_6-Mangelratten in geringerem Ausmasse zur Leberglycogenbildung als normale Kontrollen. Das synthetisierende Leberglykogen wurde zudem bei den Mangeltieren rascher abgebaut. Intravenös applizierte Glukose verschwand aus dem Blute von Pyridoxin-Mangelratten langsamer als bei B_6-ernährten Tieren [13].

Tabelle 3

Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren aus der Leber (% Fettsäuremethylester)

Tier Nr.	Vitamin B_6	C-Zahl und Doppelbindungszahl								
		12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:3	20:4
						ohne Insulin				
1	–	0,4	3,0	24,7	6,6	15,7	39,5	3,3	3,1	3,6
2	–	2,0	5,4	32,6	7,5	4,8	46,5	1,1	–	–
3	–	1,6	4,0	30,6	8,0	5,8	47,5	0,7	0,6	0,9
4	–	0,4	2,3	26,6	5,3	20,6	30,9	3,9	5,1	4,9
5	+	0,5	2,4	24,6	5,7	11,4	48,0	1,8	3,7	1,9
6	+	0,4	3,3	27,4	8,4	3,8	54,4	1,3	0,4	0,4
7	+	1,4	4,0	31,4	7,9	4,4	49,6	0,5	0,1	0,6
8	+	0,3	1,6	24,8	4,7	23,3	29,1	4,5	4,9	6,8
9	+	1,1	3,0	24,5	7,7	11,1	44,5	2,3	2,2	3,2
						mit Insulin				
10	–	1,7	5,5	30,0	6,5	6,3	47,9	1,2	0,4	0,5
11	–	0,2	2,3	26,5	7,0	10,9	47,7	2,7	1,2	1,3
12	–	1,1	4,1	28,4	9,9	9,7	43,6	1,6	0,9	0,6
13	–	1,1	3,0	28,2	5,9	14,8	39,4	1,8	2,6	3,1
14	–	1,1	3,9	31,1	8,1	4,5	50,3	0,7	–	–
15	+	0,9	3,9	27,8	9,8	9,5	44,0	2,2	0,8	0,8
16	+	0,6	2,2	24,9	7,4	13,1	45,0	2,2	2,8	1,7
17	+	0,2	1,6	27,0	9,2	18,6	36,3	3,2	3,0	1,0
18	+	1,3	5,0	32,6	9,6	6,4	43,1	1,1	0,4	0,3
19	+	1,6	4,7	28,4	10,4	12,4	36,6	1,6	1,8	2,1

Tabelle 4

Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren aus dem Carcass (% Fettsäuremethylester)

Tier Nr.	Vitamin B_6	C-Zahl und Doppelbindungszahl						
		12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
					ohne Insulin			
1	–	12,8	9,6	21,4	7,3	5,9	38,7	1,8
2	–	15,3	11,9	22,4	6,9	4,5	33,9	1,8
3	–	10,2	9,2	25,5	8,7	4,1	38,9	1,5
4	–	8,7	10,9	26,9	7,0	3,4	40,9	1,4
5	+	9,8	8,4	23,6	7,5	6,9	35,2	3,0
6	+	13,8	10,6	24,3	7,1	4,4	35,8	1,9
7	+	14,4	10,2	23,2	6,7	5,4	34,8	1,8
8	+	15,1	11,9	23,4	5,9	4,4	34,8	1,8
9	+	13,0	10,7	21,8	7,8	4,4	37,3	1,7
					mit Insulin			
10	–	13,2	9,6	23,6	6,7	4,6	38,4	1,8
11	–	11,3	9,8	23,0	7,7	5,9	37,0	2,6
12	–	14,5	10,3	23,9	7,4	4,4	35,7	1,9
13	–	16,0	9,2	23,8	6,4	3,7	38,1	1,5
14	–	13,0	11,1	23,1	7,1	4,0	38,3	1,5
15	+	13,0	9,1	23,5	8,2	4,7	36,5	1,9
16	+	16,3	10,9	23,0	6,8	3,7	36,5	1,2
17	+	15,1	10,6	24,9	7,2	3,9	36,0	1,5
18	+	14,0	10,2	23,6	7,2	4,7	35,7	2,0
19	+	13,7	11,0	24,0	8,3	3,8	36,3	1,5

Tabelle 5

Spezifische und Gesamtaktivitäten der Leber- und Carcassfettsäuren

Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Leber		Carcass	
			Gesamtfettsäuren		Gesamtfettsäuren	
			c/min · mg	c/min · mg $\times 10^6$	c/min · mg	c/min · mg $\times 10^6$
1	–	–	53738	8,205	1980	5,185
2	–	–	6726	9,652	1192	4,885
3	–	–	9992	10,144	561	4,008
4	–	–	32049	8,768	475	5,577
Mittelwert				*9,192*		*4,914*
5	+	–	29092	9,744	1356	3,465
6	+	–	11628	9,579	822	5,056
7	+	–	5807	9,432	1252	5,170
8	+	–	50954	9,272	706	4,296
9	+	–	33003	9,112	897	3,964
Mittelwert				*9,428*		*4,390*
10	–	+	16692	10,138	962	5,584
11	–	+	29099	9,692	1409	4,390
12	–	+	28430	10,090	994	5,284
13	–	+	29516	9,380	662	4,687
14	–	+	5359	10,015	779	5,422
Mittelwert				*9,863*		*5,073*
15	+	+	26807	10,507	1089	4,036
16	+	+	37207	9,898	597	4,152
17	+	+	47118	9,836	552	4,600
18	+	+	15365	9,826	987	4,229
19	+	+	28332	9,713	687	4,516
Mittelwert				*9,956*		*4,307*

Bei pyridoxinfreier Diät besteht eine erhöhte Insulinempfindlichkeit [13], [29]. Die letale Insulindosis war bei ad libitum gefütterten Mangeltieren geringer. Das Fettgewebe dieser Ratten wandelte nach Insulingaben signierte Glucose auf Grund von in-vitro-Versuchen besser in Fettsäuren um als das bei den Kontrollen der Fall war [13].

Unsere Versuche zeigten, dass die Ölsäurebildung aus Stearinsäure unter dem Einfluss von Insulin in der Leber und im Carcass von Pyridoxin-Mangelratten noch zusätzlich gehemmt wird. Das Insulin vermag demnach in diesem Wirkungsbereich das Vitamin nicht zu unterstützen. Eine Förderung der Bildung einfach ungesättigter Fettsäuren durch Insulin scheint nur in Anwesenheit von B_6 stattzufinden, während die Synthese der gesättigten Fettsäuren auch ohne Pyridoxin durch Insulin beschleunigt wird (vgl. Tabellen 8, 9, 10). Die Befunde von GELLHORN und BENJAMIN [27], [28], wonach der Einfluss auf die Bildung von Monoenfettsäuren im Bereiche der Insulinwirkungen einen Sonderfall darstellt, würden durch unsere Experimente bestätigt. Unter diesen Gesichtspunkten besteht auch eine Erklärungsmöglichkeit für die bei B_6-Mangel auftretenden Störungen der Fettsäurezusammensetzung, die durch ein-

Tabelle 6

Spezifische Aktivitäten der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren (c/min · mg) aus Leber und Carcass

Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Leber		Carcass	
			gesättigte Fettsäuren	ungesättigte Fettsäuren	gesättigte Fettsäuren	ungesättigte Fettsäuren
1	–	–	122330	10912	4127	290
2	–	–	13931	923	2467	179
3	–	–	21897	1445	1118	83
4	–	–	67715	3654	882	59
5	+	–	64749	5386	2840	237
6	+	–	26600	2984	1561	150
7	+	–	12716	1061	2373	241
8	+	–	106385	9036	1373	120
9	+	–	82966	4855	1805	164
10	–	+	38247	757	1834	134
11	–	+	66454	4457	2931	181
12	–	+	66281	3224	1963	146
13	–	+	67719	1958	1280	72
14	–	+	12861	356	1508	94
15	+	+	62078	4041	2170	186
16	+	+	90373	5242	1151	110
17	+	+	103383	9050	957	129
18	+	+	31799	3469	1824	220
19	+	+	63117	4675	1374	128

Tabelle 7

Gesamtaktivitäten der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren aus Leber und Carcass

Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Leber		Carcass	
			gesättigte Fettsäuren	ungesättigte Fettsäuren	gesättigte Fettsäuren	ungesättigte Fettsäuren
			$\times 10^6$		$\times 10^6$	
1	–	–	6,95	1,046	4,86	417760
2	–	–	8,58	0,756	4,74	390040
3	–	–	9,21	0,859	3,74	315290
4	–	–	7,82	0,577	5,17	346620
Mittelwert			*8,14*	*0,809*	*4,63*	*367430*
5	+	–	8,01	1,137	3,08	348700
6	+	–	7,53	1,613	4,66	475030
7	+	–	8,15	1,043	4,74	513850
8	+	–	7,78	0,984	4,37	348580
9	+	–	8,34	0,853	3,54	403310
Mittelwert			*7,96*	*1,126*	*4,08*	*417890*
10	–	+	9,56	0,270	5,26	393780
11	–	+	8,63	0,905	4,18	305520
12	–	+	9,27	0,693	5,16	392400
13	–	+	8,71	0,370	4,55	254050
14	–	+	9,31	0,408	5,15	333390
Mittelwert			*9,10*	*0,529*	*4,86*	*335830*
15	+	+	9,26	0,981	3,74	368990
16	+	+	8,53	0,900	3,78	403500
17	+	+	7,75	1,211	3,94	544510
18	+	+	8,42	1,299	3,80	484820
19	+	+	8,55	0,969	4,32	438900
Mittelwert			*8,50*	*1,072*	*3,92*	*448140*

Tabelle 8

Einbau des 1-^{14}C-Atoms der Stearinsäure in die Gesamtfettsäuren, die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren aus der Leber (% der gegebenen Aktivität)

Gruppe	Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Gesamtfettsäuren %	gesättigte Fettsäuren %	ungesättigte Fettsäuren %
I	1	–	–	50,92	43,13	6,49
	2	–	–	59,90	53,25	4,69
	3	–	–	62,95	57,16	5,33
	4	–	–	54,41	48,53	3,58
	Mittelwert			*57,04*	*50,52*	*5,02*
II	5	+	–	60,47	49,71	7,06
	6	+	–	59,45	46,73	10,01
	7	+	–	58,53	50,58	6,47
	8	+	–	57,54	48,28	6,11
	9	+	–	56,55	51,76	5,29
	Mittelwert			*58,51*	*49,41*	*6,99*
III	10	–	+	62,92	59,33	1,68
	11	–	+	60,15	53,56	5,62
	12	–	+	62,62	57,53	4,30
	13	–	+	58,21	54,05	2,30
	14	–	+	62,15	57,78	2,53
	Mittelwert			*61,21*	*56,45*	*3,29*
IV	15	+	+	65,21	57,47	6,09
	16	+	+	61,43	52,94	5,58
	17	+	+	61,04	48,10	7,51
	18	+	+	60,98	52,25	8,06
	19	+	+	60,28	53,06	6,01
	Mittelwert			*61,79*	*52,76*	*6,65*

Signifikanzen			
	a) Gesamtfettsäuren	Gruppe II/IV	$P < 0,05$
		Gruppe IV/II	$P < 0,05$
	b) ungesättigte Fettsäuren	Gruppe II/III	$P < 0,01$
		Gruppe III/II	$P < 0,01$
		Gruppe III/IV	$P < 0,01$
		Gruppe IV/III	$P < 0,01$

malige, kurze Pyridoxingaben eine wesentliche Verbesserung erfahren [14], [15]. Ein Überwiegen der gesättigten über die einfach ungesättigten Fettsäuren könnte zu den degenerativen Gefässveränderungen bei B_6-Mangel beitragen [17], [18]. Vielleicht besteht auch eine Parallele zu den diabetischen Angiopathien.

Da die Dehydrierung der Stearinsäure zu Ölsäure $NADPH \cdot H^+$ benötigt [35] [36], ist vielleicht ein Mangel an diesem Koferment für die Symptome bei der B_6-Avitaminose verantwortlich. Infolge seiner Funktion als Coenzym für Transaminasen bewirkt Pyridoxinmangel eine Verminderung der Glukoneogenese aus Eiweiss. Zusammen mit der verminderten Nahrungsaufnahme wäre das Auftreten der Hypoglykämie erklärbar. Die Glukoseoxydation ist bei Substratmangel begreiflicherweise reduziert, die Bildung von $NADPH \cdot H^+$ herabgesetzt. Unter solchen Bedingungen injiziertes In-

sulin würde eine weitere Blutzuckersenkung durch Verschiebung der Glukose in die Gewebe zur Folge haben. Damit träte eine Stimulation der Glykogenbildung und der Fettsäuresynthese auf und in Zusammenhang mit letzterer ein erhöhter Bedarf an $NADPH \cdot H^+$. Zu solchen Schlüssen kann das Verhalten des Blutzuckerspiegels bei Vitamin-B_6-Mangelratten berechtigen, der durch Insulin eine stärkere Senkung erfährt als bei normalen Kontrollen [37].

Ferner sei darauf hingewiesen, dass die Möglichkeit einer direkten Wirkung des Pyridoxins auf die Dehydrierungsvorgänge, die zur Ölsäurebildung führen, besteht. Insulin würde dann bei B_6-Mangel den Hemmungseffekt im Sinne der Förderung endergonischer Prozesse steigern.

Tabelle 9

Einbau des 1-^{14}C-Atoms der Stearinsäure in die Gesamtfettsäuren, die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren aus dem Carcass (% der gegebenen Aktivität)

Gruppe	Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Gesamt-fettsäuren %	gesättigte Fettsäuren %	ungesättigte Fettsäuren %
I	1	–	–	32,18	30,17	2,59
	2	–	–	30,32	29,38	2,42
	3	–	–	24,87	23,21	1,96
	4	–	–	34,61	32,10	2,15
	Mittelwert			*30,49*	*28,71*	*2,28*
II	5	+	–	21,50	19,11	2,16
	6	+	–	31,38	28,90	2,95
	7	+	–	32,08	29,42	3,19
	8	+	–	26,66	27,09	2,16
	9	+	–	24,60	21,96	2,50
	Mittelwert			*27,24*	*25,30*	*2,59*
III	10	–	+	34,65	32,61	2,44
	11	–	+	27,24	25,97	1,90
	12	–	+	32,79	32,02	2,43
	13	–	+	29,09	28,21	1,58
	14	–	+	33,65	31,94	2,07
	Mittelwert			*31,48*	*30,15*	*2,08*
IV	15	+	+	25,05	23,19	2,29
	16	+	+	25,77	23,48	2,50
	17	+	+	28,55	24,43	3,38
	18	+	+	26,24	23,56	3,01
	19	+	+	28,03	26,82	2,72
	Mittelwert			*26,73*	*24,30*	*2,78*

Signifikanzen Gesamtfettsäuren Gruppe III/IV $P < 0,05$ Gruppe IV/III $P < 0,05$

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation ist ein Beitrag zur Aufklärung der Dehydrierung von Stearinsäure zu Ölsäure, eine Reaktionsfolge, die sich als abhängig erweist von Vitamin B_6 oder Pyridoxol. B_6-Mangeltiere vermögen 1-^{14}C-Stearinsäure in geringerem Ausmasse in Ölsäure überzuführen als normale Kontrollen.

Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt und erweitert. Es konnte gezeigt werden, dass Insulingaben bei B_6-Mangeltieren die Stearinsäuredehydrierung beeinflussen. Männliche weisse Ratten, die während vieler Wochen pyridoxolfrei ernährt wurden und demzufolge deutliche Ausfallerscheinungen zeigten, vermochten nach Insulingaben ^{14}C-Stearinsäure in geringerem Masse zu dehydrieren als B_6-Mangeltiere ohne Insulin. Dieses Verhalten ist schwierig zu deuten und unsere Interpretation daher nicht als alleingültig aufzufassen.

Bei allen Ratten isolierten wir nach Tötung die Gesamtfettsäuren aus Leber und Carcass, trennten in gesättigte und ungesättigte Säuren und bestimmten die spezifischen Aktivitäten. Die anschliessende gaschromatographische Analyse dieser Fettsäuregemische ergab bei den einzelnen Gruppen keinen Unterschied.

Applikation der ^{14}C-signierten Stearinsäure, Aufarbeitung und Messung der Aktivitäten erfolgten wie bei früheren Versuchen.

Tabelle 10

Prozentuale Anteile der Aktivität der ungesättigten Fettsäuren, bezogen auf die Gesamtaktivität = 100%

Gruppe	Tier Nr.	Vitamin B_6	Insulin	Leber %	Carcass %
I	1	–	–	13,07	7,91
	2	–	–	8,10	7,61
	3	–	–	8,53	7,77
	4	–	–	6,88	6,28
	Mittelwert			*9,15*	*7,39*
II	5	+	–	12,43	10,17
	6	+	–	17,64	9,26
	7	+	–	11,35	9,78
	8	+	–	11,23	7,39
	9	+	–	9,28	10,23
	Mittelwert			*12,39*	*9,37*
III	10	–	+	2,75	6,97
	11	–	+	9,49	6,81
	12	–	+	6,96	7,07
	13	–	+	4,08	5,29
	14	–	+	4,20	6,08
	Mittelwert			*5,50*	*6,44*
IV	15	+	+	9,57	8,99
	16	+	+	9,54	9,64
	17	+	+	13,51	12,15
	18	+	+	13,36	11,32
	19	+	+	10,18	9,22
	Mittelwert			*11,23*	*10,26*

Signifikanzen	a) Leber		b) Carcass	
	Gruppe II/III	$P < 0,01$	Gruppe I/II	$P < 0,05$
	Gruppe III/II	$P < 0,01$	Gruppe I/IV	$P < 0,01$
	Gruppe III/IV	$P < 0,01$	Gruppe II/I	$P < 0,05$
	Gruppe IV/III	$P < 0,01$	Gruppe II/III	$P < 0,01$
			Gruppe III/II	$P < 0,01$
			Gruppe III/IV	$P < 0,01$
			Gruppe IV/I	$P < 0,01$
			Gruppe IV/III	$P < 0,01$

LITERATURVERZEICHNIS

[1] Wakil, S. J., J. Lipid Res. *2*, 1 (1961).
[2] Witten, P. W., u. Holman, R. T., Archs Biochem. Biophys. *41*, 266 (1952).
[3] Kirschman, J. C., u. Coniglio, J. C., J. biol. Chem. *236*, 2200 (1961).
[4] György, P., Nature *133*, 498 (1934).
[5] Birch, T. W., u. György, P., J. Soc. chem. Ind. (London) *54*, 507 (1935).
[6] Quackenbush, F. W., Platz, B. R., u. Steenbock, H., J. Nutr. *17*, 115 (1939).
[7] Quackenbush, F. W., u. Steenbock, H., J. Nutr. *24*, 393 (1942).
[8] Quackenbush, F. W., Steenbock, H., Kummerow, F. A., u. Platz, B. R., J. Nutr. *24*, 225 (1942).
[9] Medes, G., u. Keller, D. C., Archs. Biochem. *15*, 19 (1947).
[10] Sherman, H., Proc. Nutrition Symp., (Columbia University, School of Public Health) (1947), p. 15.
[11] Johnston, P. V., Kopaczyk, K. C., u. Kummerow, F. A., J. Nutr. *74*, 96 (1961).
[12] Swell, L., Law, M. D., Schools, P. E., u. Treadwell, C. R., J. Nutr. *74*, 148 (1961).
[13] Huber, A. M., Gershoff, S. N., u. Hegsted, D. M., J. Nutr. *82*, 371 (1964).
[14] Wagner, H., u. Wagner, O., unveröffentlichte Befunde.
[15] Wagner, H., u. Wagner, O., unveröffentlichte Befunde.
[16] Rinehart, J. F., u. Greenberg, L. D., Am. J. Path. *25*, 481 (1949).
[17] Rinehart, J. F., u. Greenberg, L. D., Archs Pathol. *51*, 12 (1951).
[18] Rinehart, J. F., *Connective Tissue in Health and Disease*, (G. Asbae-Hansen, Munksgaard, Copenhagen 1954). p. 239.
[19] Mushett, C. W., u. Emerson, G. A., Federation Proc. *15*, 526 (1956).
[20] Wedell, J., Jahnke, K., Daweke, H., u. Zimmermann, H., Klin. Wschr. *41*, 451 (1963).
[21] Reid, D. F., Lepkovsky, S., Bonner, D., u. Tatum, E. L., J. biol. Chem. *155*, 299 (1944).
[22] Peretti, G., Boll. Soc. ital. Biol. sper. *17*, 327 (1942).
[23] Beaton, J. R., u. Goodwin, M. E., Can. J. Biochem. Physiol. *32*, 684 (1954).
[24] McHenry, E. W., u. Gavin, G., J. biol. Chem. *125*, 653 (1938).
[25] Carter, C. W., u. Phizackerley, P. J. R., Biochem. J. *49*, 227 (1951).
[26] Beaton, J. R., Beare, S. L., Beaton, G. H., Caldwell, E. F., Ozawa, G., u. McHenry, E. W., J. biol. Chem. *207*, 385 (1954).
[27] Gellhorn, A., u. Benjamin, W., Biochem. J. *92*, 43p (1964).
[28] Benjamin, W., u. Gellhorn, A., J. biol. Chem. *239*, 64 (1964).
[29] Beaton, G. H., Haufschild, A. M., u. McHenry, E. W., J. Nutr. *60*, 455 (1956).
[30] Wagner, H., Goetschel, J. D., u. Lesch, P., Helv. chim. Acta *46*, 2986 (1963).
[31] Bernhard, K., u. Schönheimer, R., J. biol. Chem. *133*, 707 (1940).
[32] Bernhard, K., Steinhauser, H., u. Bullet, F., Helv. chim. Acta *25*, 1313 (1942).
[33] Bernhard, K., Rothlin, M., u. Wagner, H., Helv. chim. Acta *41*, 1155 (1958).
[34] Supplee, G. C., Bender, R. C., u. Hanford, Z. M., J. Amer. Pharm. Assoc. *31*, 194 (1942).
[35] Bloomfield, D. K., u. Bloch, K., Biochim. biophys. Acta *30*, 220 (1958).
[36] Bloomfield, D. K., u. Bloch, K., J. biol. Chem. *235*, 337 (1960).
[37] Beaton, J. R., Canad. J. Biochem. Physiol. *33*, 161 (1955).